

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-308977

(43)Date of publication of application : 22.11.1993

(51)Int.Cl.

C12P 7/62
 //(C12P 7/62
 C12R 1:72)
 (C12P 7/62
 C12R 1:645)
 (C12P 7/62
 C12R 1:78)

(21)Application number : 04-118943

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 12.05.1992

(72)Inventor : TAOKA NAOAKI

INOUE KENJI

TAKAHASHI SATOMI

(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 3,5-DIHYDROXYFATTY ACID ESTER DERIVATIVE

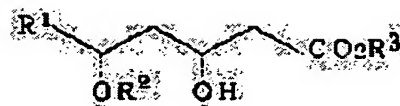
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain in an industrially advantageous way the subject compound to be used as e.g. an intermediate for specific reducing enzyme inhibitors by specifically reducing a specific optically active 5-hydroxy-3-ketofatty acid ester derivative using microorganisms belonging to e.g. Candida.

CONSTITUTION: The objective optically active (3R)-3,5-dihydroxyfatty acid ester derivative with syn-type steric configuration of formula II can be obtained by stereoscopically reducing at the 3-site keto group an optically active 5-hydroxy-3-ketofatty acid ester derivative of formula I [R¹ is lower alkoxy carbonyl, carboxyl, cyanomethyl, (protected) hydroxymethyl or halomethyl; R² is H or alcohol-protecting group; R³ is lower alkyl] [e.g. 2(S)-hydroxy-4-ketoadipic acid 1-isopropyl-6-t-butyl ester] using microorganisms belonging to Candida, Debaryomyces, Hansenula, or Trigonopsis (e.g. Candida guilliermondii IFO 1454).



I



II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

28.01.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3149265

[Date of registration] 19.01.2001

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 3 0 8 9 7 7

(43) 公開日 平成 5 年 (1 9 9 3) 1 1 月 2 2 日

(51) Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C12P 7/62

8114-4B

// (C12P 7/62

C12R 1:72)

(C12P 7/62

C12R 1:645)

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 4 - 1 1 8 9 4 3

(22) 出願日 平成 4 年 (1 9 9 2) 5 月 1 2 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 9 4 1

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

(72) 発明者 田岡 直明

兵庫県神戸市西区学園西町 7 丁目 1 番地 7

3 6 - 3 0 3 号

(72) 発明者 井上 健二

兵庫県加古川市加古川町粟津 8 2 - 2 - 5

0 1

(72) 発明者 ▲高▼橋 里美

兵庫県神戸市垂水区神和台 1 - 1 3 - 1 3

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外 1 名)

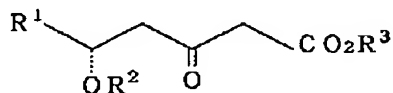
(54) 【発明の名称】 光学活性な 3, 5 - ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体の製造法

(57) 【要約】

【目的】 HMG - CoA 還元酵素阻害剤の中間体として極めて有用な syn 型の立体配置を有する光学活性 3, 5 - ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を効率的に製造する。

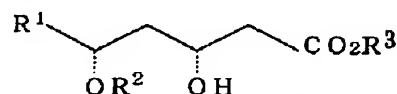
【構成】 一般式 (1) :

【化 1】



[式中、R¹は低級アルコキシカルボニル基、カルボキシル基、シアノメチル基、保護されていてもよいヒドロキシメチル基、又はハロメチル基を表し、R²はH又は一般的なアルコール保護基を表し、R³は低級アルキル基を表す。]で示される光学活性な 5 - ヒドロキシ - 3 - ケト脂肪酸エステル誘導体を、カンジダ属、デバリオマイセス属、ハンゼヌラ属及びトリゴノプシス属から成る群から選択する微生物を用いて、3 位のケト基を立体特異的に還元することによって、一般式 (2) :

【化 2】

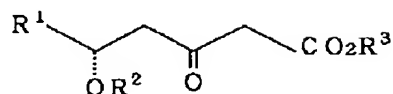


[式中、R¹、R²及びR³は前記と同義である。]で示される syn 型の立体配置を有する光学活性な (3 R) - 3, 5 - ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を製造する。

【特許請求の範囲】

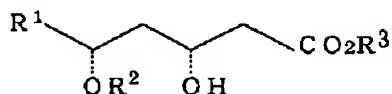
【請求項 1】 一般式(1):

【化 1】



[式中、R¹は低級アルコキシカルボニル基、カルボキシル基、シアノメチル基、保護されていてもよいヒドロキシメチル基、又はハロメチル基を表し、R²はH又は一般的なアルコール保護基を表し、R³は低級アルキル基を表す。]で示される光学活性な5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体を、カンジダ属、デバリオマイセス属、ハンゼヌラ属及びトリゴノプシス属から成る群から選択する微生物を用いて、3位のケト基を立体特異的に還元することを特徴とする、一般式(2):

【化 2】



[式中、R¹、R²及びR³は前記と同義である。]で示されるsyn型の立体配置を有する光学活性な(3R)-3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体の製造法。

【請求項 2】 R¹が、低級アルキル基、アラルキル基、アシル基又はシリル基で保護されたヒドロキシメチル基である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】 R¹が、ベンゾイル基で保護されたヒドロキシメチル基である請求項 1 又は 2 記載の製造法。

【請求項 4】 R¹が低級アルコキシカルボニル基である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】 R¹がイソプロポキシカルボニル基である請求項 1 又は 4 記載の製造法。

【請求項 6】 R¹がイブチル基である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物を用いて、光学活性なS-又はR-5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体を還元して、syn型の立体配置を有する光学活性(3R)-3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を製造する方法に関する。光学活性3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体は、医薬品合成の中間体として重要である。特に、syn型の立体配置を有する(3R,5S)-3,5,6-トリヒドロキシヘキサノ酸エステル誘導体、(2S,4R)-2,4-ジヒドロキシアジピン酸エステル誘導体等の3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体は、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA(HMG-CoA)還元酵素阻害剤の中間体として有用なことが知られている。

【0002】

【従来の技術】光学活性3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エ

ステル誘導体を得るために、5-ヒドロキシ-3-オキソ脂肪酸エステル誘導体を還元する方法として、トリエチルボランを用いる方法[ケミストリー・レターズ(Chem. Lett.)、1923-1926(1981)]及びテトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Lett.)、28、155(1987)、不斉触媒を用いて接触水素還元する方法(特開平2-289537号)及びチタンイソプロポキシaidを用いて還元する方法[ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.)、56、4050(1991)]が知られている。

【0003】

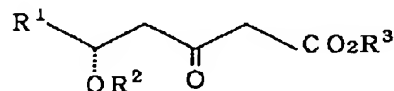
【発明が解決しようとする課題】上記の化学的な合成法は、高価な試薬を必要とする、触媒の調製が煩雑である、超低温あるいは高温・高圧で反応を行わなければならない等、いずれの方法も工業的製法としては、改善すべき点を有している。従って、本発明の目的は、syn型の立体配置を有する光学活性3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を、高価な試薬を使わず、穏やかな条件下で製造することのできる方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】光学活性なS-又はR-5-ヒドロキシ-3-オキソ脂肪酸エステル誘導体の還元、ある種の微生物を用いると、穏やかな条件下に、syn型の立体配置を有する光学活性(3R,5S)-又は(3R,5R)-3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を立体特異的に製造できることがわかった。

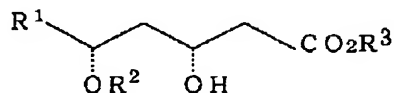
【0005】すなわち、本発明は、一般式(1):

【化 3】



[式中、R¹は低級アルコキシカルボニル基、カルボキシル基、シアノメチル基、保護されていてもよいヒドロキシメチル基、又はハロメチル基を表し、R²はH又は一般的なアルコール保護基を表し、R³は低級アルキル基を表す。]で示される光学活性な5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体を、カンジダ(Candida)属、デバリオマイセス(Debaryomyces)属、ハンゼヌラ(Hansenula)属及びトリゴノプシス(Trigonopsis)属から成る群から選択する微生物を用いて、3位のケト基を立体特異的に還元することを特徴とする、一般式(2):

【化 4】



[式中、R¹、R²及びR³は前記と同義である。]で示されるsyn型の立体配置を有する光学活性な(3R)-3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体の製造法に関す

る。

【 0 0 0 6 】化合物(1)および(2)は、 R^1 がシアノメチル基の場合は(5R)-ヒドロキシ体であり、 R^1 がその他の基の場合は(5S)-ヒドロキシ体となる。

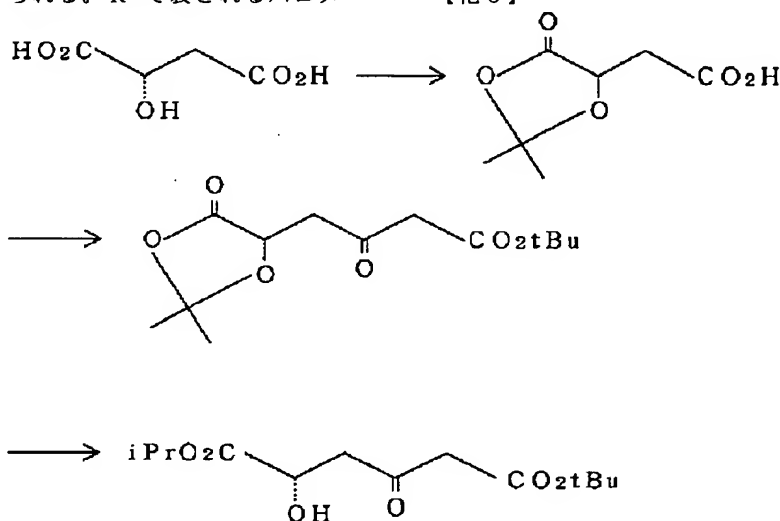
【 0 0 0 7 】前述式(1)及び(2)において、 R^1 で表される低級アルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、イソブトキシカルボニル基、 t -ブトキシカルボニル基等、好ましくはエトキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基が挙げられる。 R^1 で表されるヒドロキシメチル基の保護基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、 t -ブチル基等の低級アルキル基、ベンジル基等のアラルキル基、アセチル基、ベンゾイル基等のアシル基、 t -ブチルジフェニルシリル基、 t -ブチルジメチルシリル基、トリメチルシリル基等のシリル基、トシル基、メシル基等のスルホニル基が挙げられる。 R^1 で表されるハロメ

チル基としては、クロロメチル基、ブロムメチル基、ヨードメチル基等が挙げられる。 R^1 で表される低級アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、 t -ブチル、イソブチル等、好ましくは t -ブチル基が挙げられる。

【 0 0 0 8 】本発明の方法において3R-ヒドロキシ体を生成する微生物は、カンジダ属、デバリオマイセス属、ハンゼヌラ属及びトリゴノブシス属の微生物である。

【 0 0 0 9 】本発明の原料である5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体(1)は、その構造に応じて種々の方法を利用して合成できる。例えば一般式(1)において、 R^1 がイソプロポキシカルボニル基、 R^2 がH、 R^3 が t -ブチル基である2-ヒドロキシ-4-オキソアジピン酸1-イソプロピル6- t -ブチルの場合、リンゴ酸をアセトニド化した後、2炭素増炭反応に付し、エステル化することによって合成できる。

【化5】



【 0 0 1 0 】本発明方法において、使用する微生物は、液体培地に菌株を培養して得られた培養物、培養液から分離した菌体、あるいは菌体もしくは培養物を処理して得られる乾燥菌体、又は固定化菌体等のいずれの形態のものも用いることができる。操作は回分式、半回分式、または連続式のいずれでも行うことができる。

【 0 0 1 1 】本発明の方法の好ましい一態様を次に説明する。まず、pH 3 ~ 8 の液体培地 10 ml に斜面培地より種菌を接種し、10 ~ 50 °C で1 ~ 5 日間好氣的に振とう培養した後、遠心分離により菌体を得る。次いで、この菌体に、グルコース 4 % 濃度の緩衝液(pH 3 ~ 8) 5 ml を加え、10 ~ 50 °C で1時間前培養した後、5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体(1) 1 ~ 100 g/l を添加し、10 ~ 50 °C で数時間ないし5日間振とうする。反応終了後、生成した反応溶液中の3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体(2)を、有機溶媒による抽出等の操作により回収する。

【 0 0 1 2 】前記培地は、炭素源として、グルコース、シュクロース等の糖質、エタノール、グリセロール等のアルコール類、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸及びそのエステル類、菜種油、大豆油等の油類、窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティープリカー、ふすま、酵母エキス等、無機塩類として、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸1水素カリウム、リン酸2水素カリウム等、他の栄養源として、麦芽エキス、肉エキス等を含有し得る。

【 0 0 1 3 】微生物による5-ヒドロキシ-3-ケト脂肪酸エステル誘導体(1)の還元の結果、菌体内の還元体補酵素が減少し、やがて反応は停止する。反応を続けるためには還元体補酵素を再生することが望ましい。そのためには、通常、上記の炭素源を添加すればよい。

【 0 0 1 4 】以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるもの

ではない。

【0015】

【実施例】

実施例1～4

グルコース(40g)、酵母エキス(3g)、 KH_2PO_4 (0.7g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.3g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.8g)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.06g)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.09g)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.005g)、 MnSO_4 (0.01g)、 NaCl (0.1g)及び水(1L)からなる液体培地(pH=6.8)を試験管に10mlずつ分注し、オートクレーブにて121℃で20分間、加熱殺菌した。各培地に、斜面培地から表1に記載した各種の菌株をそれぞれ接種し、30℃で1～2日間、好氣的に振とう培養した。培養後、遠心分離により集菌し、0.1Mリン酸緩衝液(pH=7.0)で洗浄した後、グルコース4%を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH=7.0)5mlを加え、30℃で1時間培養した。次いで、2(S)-ヒドロ

実施例 菌株

番号

1

カンジダ・ギリエルモンディ

(*Candida guilliermondii*)

IFO 0454

2

デバリオマイセス スピーシーズ

(*Debaryomyces sp. G list et Guel*)

IFO 0064

3

ハンゼヌラ・サツルヌス

(*Hansenula saturnus*)

IFO 0809

4

トリゴノプシス・バリアリス 94 16

(*Trigonopsis variabilis*)

IFO 0671

【0017】実施例5

実施例1～4と同様の手順に従って、ハンゼヌラ・サツルヌス IFO 0809 を用い、2(S)-ヒドロキシ-4-ケトアジピン酸1-エチル6-ヒープチルを、2,4-ジヒドロキシアジピン酸1-エチル6-ヒープチルに変換した。

収率=87%

異性体過剰率 $[\{(4\text{Rヒドロキシ体}\% - 4\text{Sヒドロキシ体}\%) / (4\text{Rヒドロキシ体}\% + 4\text{Sヒドロキシ体}\%) \} \times 100\%] = 74\% \text{d.e.}$

【0018】実施例6

実施例1～4と同様の手順に従って、ハンゼヌラ・サツルヌス IFO 0809 を用い、6-ベンゾイロキシ-

キシ-4-ケトアジピン酸1-イソプロピル6-ヒープチル0.5%を加え、30℃で24時間振とうした。

【0016】反応後、遠心分離により菌体を除去し、高圧液体クロマトグラフィー[ファインパック(Finepak) C₁₈、溶離液アセトニトリル/水=1/1、流速1ml/分、検出波長210nm]にて各反応溶液の2,4-ジヒドロキシアジピン酸1-イソプロピル6-ヒープチルの生成量を測定した。反応溶液からヘキサンにより抽出した2,4-ジヒドロキシアジピン酸1-イソプロピル6-ヒープチルの光学純度を、高圧液体クロマトグラフィー[キラルセル(Chiralcel) OD、溶離液ヘキサン/イソプロパノール=20/1、流速2ml/分、検出波長210nm]にて測定し、異性体過剰率[%d.e.: $\{(4\text{Rヒドロキシ体}\% - 4\text{Sヒドロキシ体}\%) / (4\text{Rヒドロキシ体}\% + 4\text{Sヒドロキシ体}\%) \} \times 100\%]$ を求めた。その結果は表1に示す通りであった。

【表1】

収率 異性体過剰率
(%) (%d.e.)

98

84

88

92

100

80

5(S)-ヒドロキシ-3-ケトヘキサン酸ヒープチルを6-ベンゾイロキシ-3,5-ジヒドロキシヘキサン酸ヒープチルに変換した。

収率=15%

異性体過剰率 $[\{(3\text{Rヒドロキシ体}\% - 3\text{Sヒドロキシ体}\%) / (3\text{Rヒドロキシ体}\% + 3\text{Sヒドロキシ体}\%) \} \times 100\%] = 60\% \text{d.e.}$

【0019】

【発明の効果】本発明の方法により、HMG-CoA還元酵素阻害剤の中間体として極めて有用なsyn型の立体配置を有する光学活性3,5-ジヒドロキシ脂肪酸エステル誘導体を効率的に製造することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12P 7/62

C12R 1:78)